



図 1 ピエゾ型非磁性触覚刺激装置

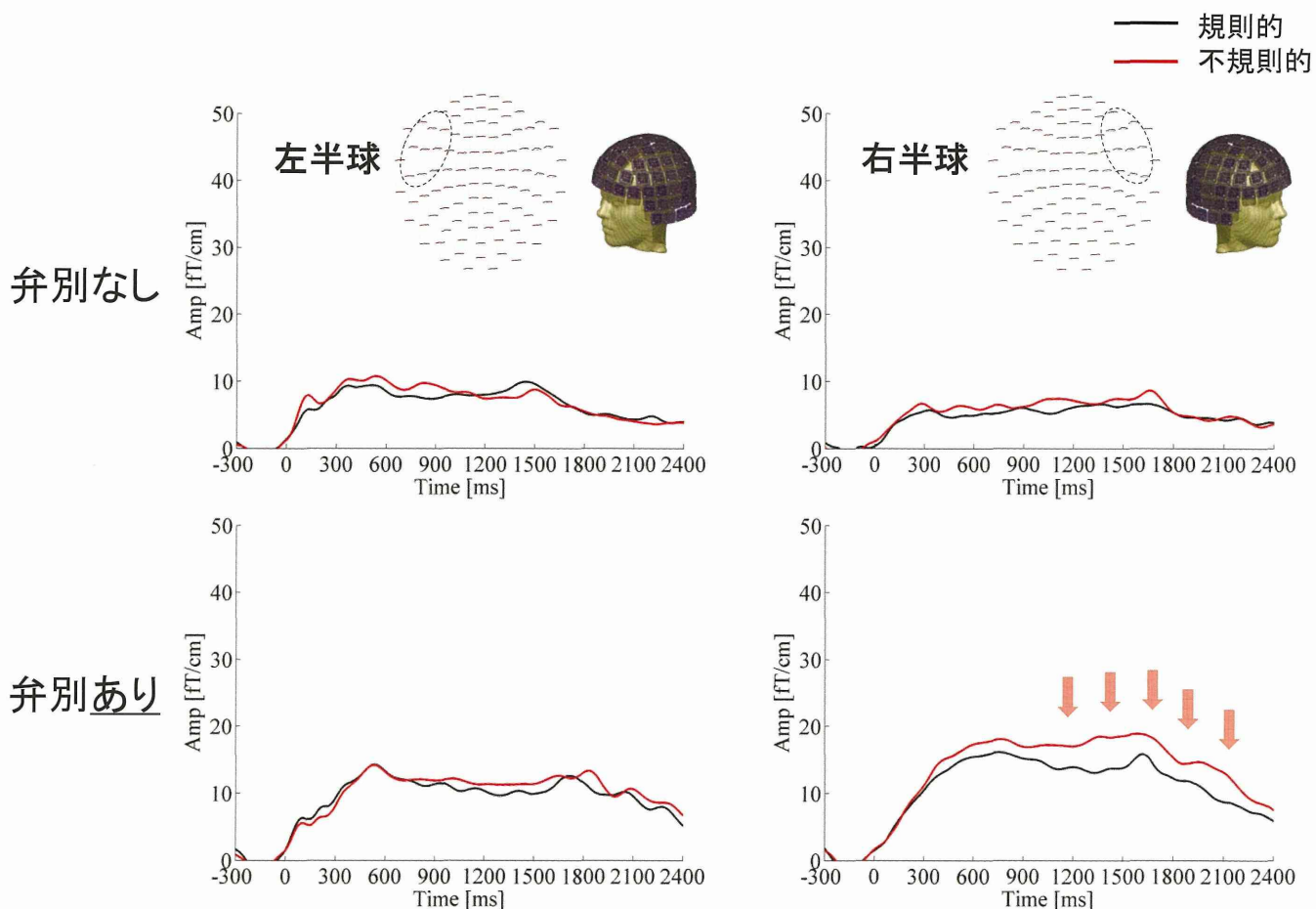


図 2 テクスチャー弁別課題時の誘発脳磁界
 弁別ありの時はなしの時に比べて、右大脳半球に強い脳活動を認めた(矢印)。

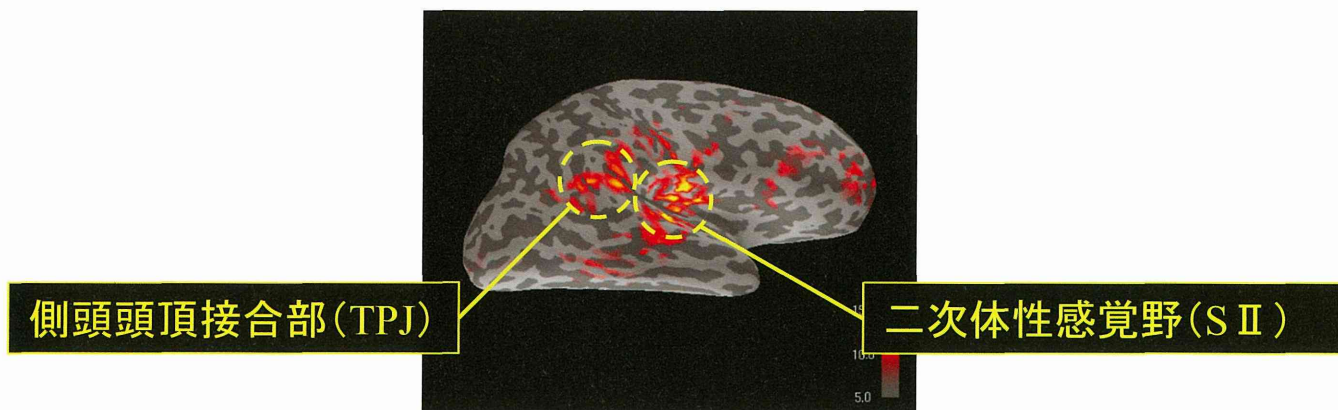


図 3 誘発脳磁界からの推定電流源
 テクスチャー弁別に関わる脳活動(図 2 矢印)はSIIとTPJに推定された。

分担研究報告書

ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルの作成とその解析

研究分担者	中西 洋一	九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野	教授
研究協力者	濱田 直樹	九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野	助教
	横山 哲也	九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野	
	鈴木 邦裕	九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野	

研究要旨 マウスに Benzo[a]pyrene を経気管的に投与することにより、気道分泌物が増加するマウスモデルを作成した。ダイオキシン類による肺傷害の動物実験モデルとして有用と考えられるが、常に一定した病変を作成できるレベルまでには到達しておらず、安定したモデルの作成を目指して検討を進めている。また、麦門冬湯により油症患者の呼吸器症状が改善した報告を受けて、同モデルにおける麦門冬湯の効果を検討したが、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の低下を認めたものの、効果は限定的であり、更なる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

油症発生から既に 44 年経過したが、油症患者には、未だに呼吸器症状が認められる。そのメカニズムには不明な点が多いが、油症の主な原因物質と考えられている PCDFs を投与した動物実験モデルでは、電子顕微鏡にてクララ細胞の壊死が認められており、病変の主座はクララ細胞を中心とした細気管支領域と考えられている。クララ細胞は Aryl hydrocarbon receptor (AhR) を発現しており、それを介してダイオキシン類が肺傷害を引き起こすと推測されるが、詳細は不明である。当科では、そのメカニズムを解明するために、まずは動物実験モデルの作成を目指して研究を進めてきた。最初にダイオキシン類をマウスに全身投与して肺傷害が引き起こされるかどうか検討したが、蛋白レベルで解析可能なモデルを作成することができなかった。次いで、直接マウスの肺に経気管的に投与することにより検討し、気道分泌物の増加等を示すモデルを作成することはできたが、個体差によるばらつきが大きく、再現性が高い動物実験モデルができたとはいえなかった。よって、病態解析に使用

可能なレベルの動物実験モデルを確立させることを目的とした。

また、油症患者の呼吸器症状が漢方薬の麦門冬湯で改善された報告¹⁾を参考に、この動物実験モデルを使用して、麦門冬湯の効果についても検討した。

B. 研究方法

Benzo[a]pyrene (BaP) をマウスに経気管的に投与し、肺組織、気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) 液の解析を行った。また同モデルにおける麦門冬湯の抑制効果についても検討を行った。

C57BL/6 マウス、雄、8-10 週齢に、Tricaprylin で溶解した BaP を、1 匹あたり 400 μ g (50 μ l) 経気管的に投与した²⁾³⁾。対照群には Tricaprylin を 50 μ l 投与した。投与 24 時間後に肺を取り出して、HE 染色、Alcian blue-PAS (AB-PAS) 染色にて組織学的に評価した。また BAL を施行して BAL 液中の総細胞数、細胞分画、タンパク濃度、代表的なサイトカインやケモカイン

(TNF- α , IL-1 β , MCP-1) の濃度を ELISA 法にて測定した。またこれまでの研究において BaP 投与群の肺組織の免疫組織学的

検討にて、肺サーファクタントプロテインの高発現を認めたことから、BAL 液中のサーファクタントプロテイン (SP-A, SP-D) の濃度を ELISA 法にて測定した。

併せて、BaP 投与の 24 時間前と投与時に、麦門冬湯を 400mg/kg 経口投与して、BaP による肺傷害への効果を検討した。

(倫理面への配慮)

九州大学動物実験実施規則に従って実験を行った。

C. 研究結果

組織学的には、HE 染色では明らかな差を認めなかったが、AB-PAS 染色では、BaP 投与群において、中枢側気管支の気道上皮細胞に陽性細胞を認めた(図 1)。

BAL 液の解析では、対照群と比較して、BaP 投与群では BAL 液中の総細胞数とマクロファージ数が有意に上昇しており、それは麦門冬湯投与により有意に抑制された(図 2a, b)。好中球数は、対照群と比較して BaP 投与群では上昇傾向であったが有意差は認めず、リンパ球も有意な差を認めなかった。BAL 液中の蛋白濃度は、対照群と比較して BaP 投与群では有意な差を認めなかったが、BaP+麦門冬湯投与群では、対照群と比較しても BaP 投与群と比較しても有意に上昇していた(図 2c)。

また BAL 液中の代表的なサイトカイン、ケモカイン濃度を測定したが、対照群、BaP 投与群、BaP+麦門冬湯投与群間の比較にて、TNF- α 、MCP-1 の濃度に有意な差は認めなかった(図 3)。なお、IL-1 β 、SP-A、SP-D に関しては検出感度以下であったため解析不能であった。

D. 考察

マウスに BaP を経気管的に投与することにより、AB-PAS 染色陽性の気道上皮細胞の増加を認めたが、これらはムチン類の増加、すなわち気道分泌物の増加を表していると考えられる⁴⁾。油症患者に喀痰の増

加が認められる点からも、このモデルは動物実験モデルとして有用と思われる。しかし、動物疾患モデルとして確立するためには、必要十分な BaP の投与量および確実な投与方法を設定することが重要である。これまで、経気管的に 1 日 1 回、3 日間連続で投与する方法や、1 日間のみ高容量で投与する方法などで検討してきたが、前者では病変はできたものの、個体によりばらつきが認められ、後者では病変の程度が弱かった。この理由として、Tricaprylin で溶解した BaP は粘度が高く、気道に投与する際に、気管内挿管し、多数のマウスに同じ量を投与するのは、手技的に難度が高いことが考えられた。3 回投与すると、投与量のばらつきが更に拡大するため、1 回投与にてばらつきを軽減するよう計画したが、十分な病変ができなかった。現在、麻酔薬を呼吸抑制が少ない薬剤に変更したり、投与経路を、経気管投与よりも簡便な経鼻投与に変更したりして、より有用な動物実験モデルを作成すべく検討を重ねている。同時に、経口投与や経腹腔内投与といった全身投与モデルについても、再度検討を開始したところである。

また、油症患者の呼吸器症状が漢方薬の麦門冬湯で改善された報告¹⁾を参考に、麦門冬湯の効果に関しても、この動物実験モデルを使用して検討を開始した。今回施行した BaP の投与方法・用量では、軽微な病変しかできなかつたため、あくまでも参考所見ではあるが、BAL 液の解析では、BaP 投与群で有意に増加した総細胞数やマクロファージ数が、麦門冬湯投与にて有意に抑制されていた。しかし気道分泌物を反映すると考えられる蛋白濃度は、BaP+麦門冬湯群では、予想と反して有意な上昇を認めるなど、判断に迷う結果が得られた。BAL 液中の蛋白はムチン以外にも存在するため、その点からの検討も加えていきたいと考えている。

また、近年、TCDD をマウスの腹腔内に

投与し、全肺を mRNA レベルで検討すると、CYP1A1、MUC5AC の上昇や、IL-1 β 等のサイトカインの上昇が認められ、かつそれらは AhR の発現を変異させたマウスでは抑制されていたという報告があった⁴⁾。また *in vitro* の検討では BaP は AhR を介して気道上皮細胞の MUC5AC 発現を増強させ、ムチンの産生を亢進するという報告もあった⁵⁾。炎症や活性酸素がダイオキシン類による肺傷害において重要であると考えられ、今回、BAL にて代表的なサイトカインやケモカインを評価してみたが、有意な結果を得ることができなかった。これはひとつには病変形成が乏しかったことが原因なのではないかと考えられ、安定した動物実験モデルの確立後、再度検討したいと考えている。

ダイオキシン類による肺傷害に関しては、そのメカニズムについて未だ不明な点が多く、今後も解析を進めていきたいと考えている。

E. 結論

マウスに BaP を経気管的に投与することによって気道分泌物が増加するマウスモデルを作成した。ダイオキシン類による肺傷害の動物実験モデルとして有用と考えられたが、確立するためには、更なる検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1) 濱田直樹, 横山哲也, 鈴木邦裕, 緒方彩子, 三雲大功, 原田英治, 前山隆茂, 中西洋一. ダイオキシン類による肺傷害のメカニズムに関する研究- 動物モデルの作成-. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 平成 24 年 4 月 20- 22 日

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 参考文献

- 1) Uchi H, et al. A clinical trial of Kampo Formulae for the treatment of symptoms of Yusho, a poisoning caused by dioxins and related organochlorine compounds. Evid Based Complement Alternat Med. Epub 2011 Jan 9.
- 2) Podechard N, et al. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. Toxicol Lett. 2008;177(2):130-7
- 3) N' Diaye M, et al. Aryl Hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. J Biol Chem. 2006;281(29):19906-15.
- 4) Wong PS, et al. Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010;42(2):210-7.
- 5) Chiba T, et al. Arylhydrocarbon receptor activation in airway epithelial cell induces MUC5AC via reactive oxygen species production. Pulm Pharmacol Ther. 2011;24:133-40

図 1 AB-PAS 染色 BaP 投与群 a. x100 b. x200

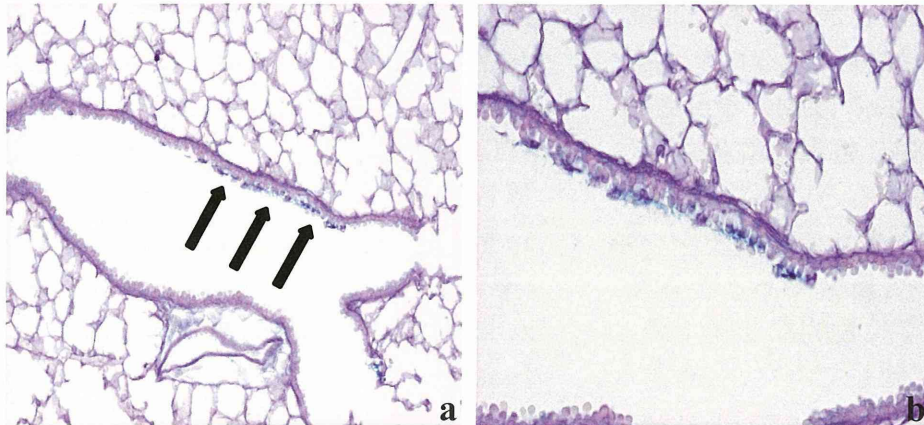


図 2 気管支肺胞洗浄液 細胞数・蛋白濃度

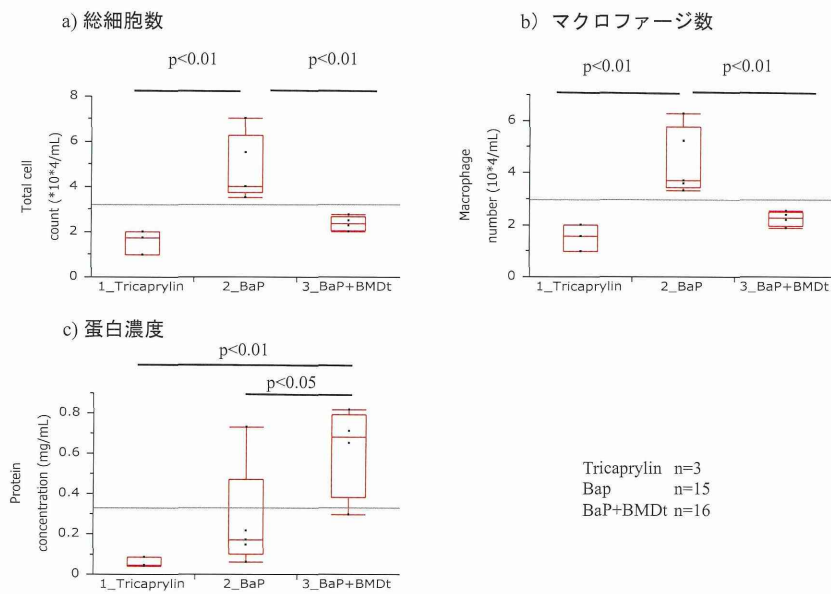
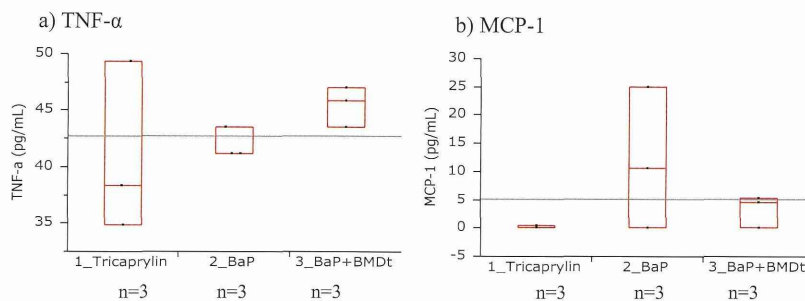


図 3 気管支肺胞洗浄液 サイトカイン・ケモカイン濃度



分担研究報告書

ダイオキシンによる肝臓ロイコトリエン B4 増加の機構解析

研究分担者	山田 英之	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	教授
研究協力者	石井 祐次	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	准教授
研究協力者	武田 知起	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	助教

研究要旨 昨年度の研究により、ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 60 µg/kg) の経口投与が、尿・糞および組織中のメタボロームプロファイルを大きく変動させることを見出した。本研究では、それらの中で肝臓のロイコトリエン B4 (LTB4) 増加に着目し、その発現機構ならびに毒性との関連性を検討した。LTB4 の合成および代謝酵素の発現に及ぼす TCDD の影響を解析した結果、アラキドン酸を LTA4 に変換する 5-lipoxygenase (5-LOX) の誘導と、LTA4 を LTC4 に変換する LTC4 synthase の減少が観察され、これらは代表的な急性毒性である肝肥大の発現とほぼ相関した。一方、LTB4 代謝酵素である cytochrome P450 4F1 には有意な変化は観察されなかった。肝と同様な変動は肺においては観察されず、TCDD による影響は肝臓に特異性が高いことが示唆された。リガンド親和性が異なるダイオキシン受容体 (AhR) を有する二系統のマウス (C57BL/6J: 高親和性、DBA/2J: 低親和性) への TCDD 曝露による 5-LOX 発現変動を解析したところ、C57BL/6J マウスでより低用量より誘導が観察された。以上の成果から、TCDD は肝臓において AhR 依存的な 5-lipoxygenase の誘導、ならびに LTC4 synthase の減少を介して LTB4 を蓄積させ、これが肝障害の発現あるいは増悪に寄与する可能性が見出された。

A. 研究目的

ダイオキシンは、消耗症および肝障害等の多岐にわたる毒性を惹起する。その毒性の多くは、細胞質に存在する aryl hydrocarbon receptor (AhR) の活性化を介する遺伝子発現変動を起点として生起すると考えられている (1, 2)。しかし、どの遺伝子変動が毒性発現に寄与するのかは十分には理解されていない。当研究室では、昨年度のラットを用いた研究により、最強毒性のダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 60 µg/kg、経口) が、尿・糞および組織中のメタボロームプロファイルを顕著に変動させることを明らかにしている (H23 年度分担研究報告書)。それらの中で、肝臓においてはアラキドン酸の減少とロイ

コトリエン B4 (LTB4) の増加が確認された。LTB4 は強力な白血球遊走作用を有し、炎症応答に重要である (3)。従って、これの蓄積は肝障害の発現あるいは増悪に直結する重要因子である可能性が考えられる。本研究では、肝臓への LTB4 蓄積に着目し、その発現機構ならびに毒性との関連性を検討した。

B. 研究方法

1) 動物処理

5 週齢の Wistar 系雄性ラットに TCDD (1、5、10、20、30 および 60 µg/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油を経口投与した。投与 7 日後に体重を測定したのち臓器を採取した。一部の実験では、摂餌量を TCDD 群

と同じに制限した pair-fed 群を作成し、同様にコーン油を処理したのち投与後 7 日目に肝臓を摘出した。

ダイオキシン類に対して高親和性の AhR を発現するマウス (C57BL/6J 系統) と低親和性 AhR 発現マウス (DBA/2J 系統) に、それぞれ以下に示す用量で TCDD を経口投与し、投与 7 日後に肝臓を摘出した。C57BL/6J: 1、5、10、20、50 および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; DBA/2J: 20、100、500 および 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2) イムノブロットイング

5-Lipoxygenase (5-LOX) タンパク質の発現変動は、イムノブロット法により以下の要領で解析した (4)。摘出した肝臓を、4 倍量の 50 mM Tris-HCl buffer [pH7.4、1.0 mM EDTA、1.0 mM EGTA、1 \times protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics 社)、1 mM NaF] にてホモジナイズした。これを 2,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、上清をさらに 9,000 $\times g$ で 20 分間遠心分離した。得られた上清は、105,000 $\times g$ で 60 分間遠心分離してサイトゾル画分を得、これを電気泳動に付した。電気泳動に用いたタンパク質量は以下の通りである。5-LOX: 30 μg および β -actin: 3 μg 。検出用基質には、Clarity Western ECL substrate (バイオラッド社) を使用し、ChemiDocTM MP system (バイオラッド社) を用いて解析した。各目的タンパク質の発現は、 β -actin で補正したのち、対照群に対する割合として算出した。

3) リアルタイム RT-PCR

摘出臓器より total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (5)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green I Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。分析対象 mRNA の発現は、 β -actin mRNA で補正して算出した。

(倫理面への配慮)

本研究における全ての動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認を受けた上で、可及的に動物の苦痛を排除して実施した (動物実験承認番号: A23-163-0 および A23-163-1)。

C. 研究結果

本研究において用いた TCDD 曝露条件により、典型的なダイオキシン毒性が惹起されることを確認するため、体重増加抑制および肝肥大を指標として検討を行った。その結果、TCDD 投与 7 日後における有意な体重増加抑制は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肝肥大は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より用量依存的に観察された (Fig. 1)。

LTB4 の合成/代謝酵素の mRNA 発現変動を解析した結果、TCDD はアラキドン酸を LTB4 の直前の前駆物質である LTA4 に変換する 5-LOX を用量依存的に誘導し、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量では有意差が観察された (Fig. 2)。LTB4 の蓄積と符合して、LTA4 を LTC4 に変換する LTC4 synthase (LTC4S) は用量依的に減少した (Fig. 2)。LTB4 の代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) 4F1 と、LTA4 を LTB4 に変換する LTA4 hydrolase (LTA4H) は変動しなかった (Fig. 2)。肝臓における 5-LOX の誘導は、タンパク質レベルにおいても同様に確認された (Fig. 3)。一方、肝と同様な変動は肺においては観察されなかった (Fig. 4)。

5-LOX 誘導および LTC4S 減少の機構に、TCDD 依存的な摂餌量減少が寄与するか否かを検討するため、摂餌量を TCDD 群と同じに制限した pair-fed 群を作製して検討を行った。その結果、5-LOX の発現は pair-fed による影響は認められなかったものの、LTC4S は顕著な低下が認められ、TCDD 曝露群に近似する低値を示した (Fig. 5)。さらに、ダイオキシンに対する親和性の異なる AhR を有する

二系統のマウス (C57BL/6J および DBA/2J) を用いて、TCDD による 5-LOX 誘導性の違いを比較した。その結果、両系統ともに用量依存的な 5-LOX の誘導は観察されたものの、高親和性 AhR を有する C57BL/6J 系統でより低用量より誘導が惹起された (Fig. 6)。

D. 考察

TCDD による肝臓での LTB₄ 増加の機構を明らかにするため、LTB₄ 合成/代謝酵素の発現変動を解析した結果、TCDD はアラキドン酸を LTA₄ に変換する 5-LOX の誘導と、LTA₄ を LTC₄ に変換する LTC₄S の減少を用量依存的に惹起した。このことから、TCDD は 5-LOX の誘導ならびに LTC₄S の減少を介して、LTB₄ を蓄積させる機構が強く示唆された。LTB₄ は、肝障害の誘発ならびに増悪に関与することが報告されており (6)、これの肝臓への蓄積は TCDD による肝障害に直結する有力候補と考えられる。TCDD による肝肥大と 5-LOX 誘導および LTC₄S 減少がほぼ相関した用量依存性を示すとこの本検討結果は、TCDD 依存的肝障害に両酵素変動を介する LTB₄ 増加が寄与する可能性を支持する。今後、LTB₄ 増加の毒性学的意義について、肝障害との関連性に着目した解析を行うことが重要である。

肺においては、5-LOX 等の変動は観察されず、これらの影響は肝臓に特異性が高いものと推定された。しかし、この解釈には注視すべき点もある。一般に、投与した TCDD はその大半が肝臓や脂肪組織に蓄積するため、投与数日後には肝臓とその他の臓器間での蓄積量の差は 20 倍以上のものぼる (7, 8)。従って、肝臓への影響が顕著である原因は、蓄積量の違いに基づく可能性も考えられる。ダイオキシンは、慢性的曝露により肺にも障害を起すため (9, 10)、曝露方法や曝露後の時間によって

は肺にも LTB₄ が蓄積する可能性は否定できない。LTB₄ 蓄積の毒性学的意義付けとともに、この点も明らかにすべきである。

本研究では、TCDD による両酵素の変動機構を解析するため、第一に TCDD 依存的な摂餌量減少の寄与を調査した。その結果、TCDD 群に摂餌量を制限した pair-fed 群においても LTC₄S の減少が確認され、本酵素の低下は摂餌量減少に伴って生起することが示唆された。第二に、5-LOX 誘導に AhR が関与するか否かを検討するため、リガンドに対する親和性が異なる AhR を有する二系統のマウスを用いて応答性の違いを比較した。その結果、高親和性 AhR を有する C57BL 系統において、より低用量より 5-LOX の発現誘導が観察され、5-LOX 誘導には AhR が関与することが強く示唆された。ダイオキシン-AhR 複合体が結合する DNA 応答配列 (5'-CACGC-3') は、5-LOX の 5'-遺伝子上流 10,000 bp までの間に複数ヶ所存在することから、AhR がこれらに直接的に作用する機構が想定される。一方、AhR を介して種々のサイトカイン・ケモカインの発現が変動し (11)、これらが 5-LOX の発現を誘導する可能性も考えられる。事実、サイトカインの中には LTB₄ 合成/代謝酵素発現に関わるものも報告されている (12, 13)。今後、これらの点に着目して AhR 依存的な 5-LOX 誘導機構を明らかにする必要がある。

E. 結論

TCDD は肝臓において AhR 依存的に 5-LOX を誘導すると共に、LTC₄ への変換を抑制することによって LTB₄ を増加させ、これらがダイオキシン依存的な肝障害の誘発あるいは増悪に関与する可能性が見出された。

F. 学会発表

1. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキ

シコロジー (名古屋、2012 年 10 月)
2. 日本薬学会第 133 年会 (横浜、2013 年 3 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

H. 引用文献

1. Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**: 173-179 (1996).
2. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y, *Genes Cells*, **2**: 645-654 (1997).
3. Yokomizo T, *福岡医誌*, **97**: 183-191 (2006).
4. Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T, Yamada H, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**: 1091-1099 (2009).
5. Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H, *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 365-373 (2010).
6. 溝口靖紘, 阪上吉秀, 河田則文 *Ther. Res.*, **9**: 840-845 (1988).
7. Abraham K, Krowke K, Nenbert D, *Arch. Toxicol.*, **62**: 359-368 (1988).
8. Ishida T, Matsumoto Y, Takeda T, Koga T, Ishii Y, Yamada H, *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 563-569 (2010).
9. Tritscher AM, Mahler J, Portier CJ, Lucier GW, Walker NJ, *Toxicol. Pathol.* **28**: 761-769 (2000).
10. Brix AE, Jokinen MP, Walker NJ, Sells DM, Nyska A, *Toxicol. Pathol.*, **32**: 333-337 (2004).
11. Esser C, Rannug A, Stockinger B, *Trends Immunol.*, **30**: 447-454 (2009).
12. Crooks SW, Stockley RA, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**: 173-178 (1998).
13. Kalsotra A, Anakk S, Brommer CL, Kikuta Y, Morgan ET, Strobel HW, *Arch. Biochem. Biophys.*, **461**: 104-112 (2007).

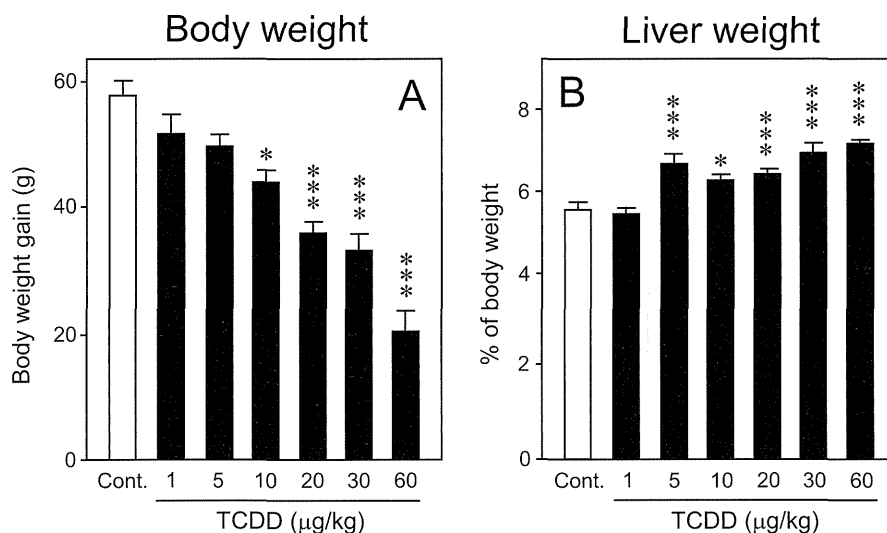


Fig. 1. Dose-dependent effect of TCDD on the weight of body (A) and liver (B) in male pubertal rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 5-16 rats. Significantly different from control: * p <0.05 and *** p <0.001. The body weight at the beginning of treatment in the control was 128 ± 9 g (mean \pm S.E.M., N=9).

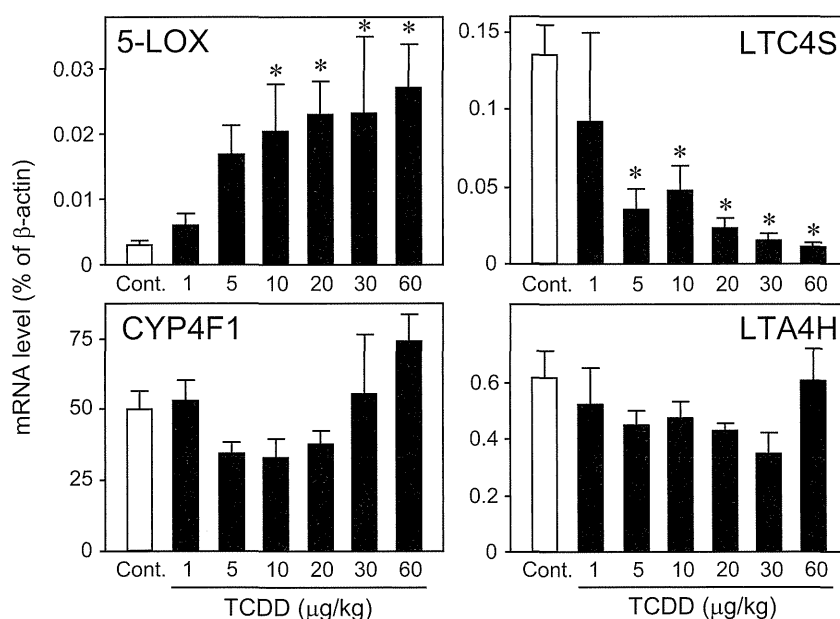


Fig. 2. Dose-dependent effect of TCDD on the expression of mRNAs coding for leukotriene synthesizing and metabolizing enzymes in the liver of male pubertal rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different from control: * p <0.05.

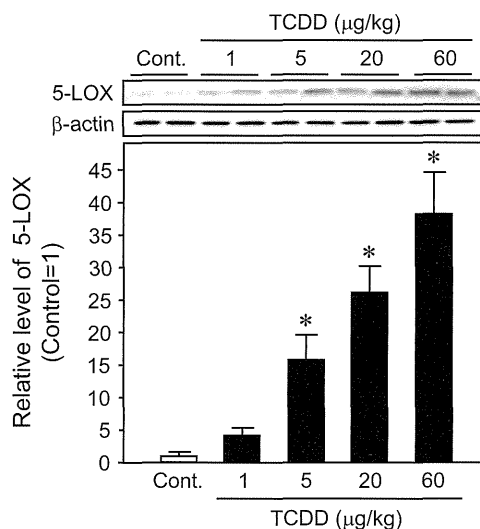


Fig. 3. Dose-dependent effect of TCDD on the expression of 5-lipoxygenase protein in the liver of male pubertal rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 4 rats. Relative value to the control (=1; 5-LOX/ β -actin intensity) is shown. Significantly different from control: * p <0.05.

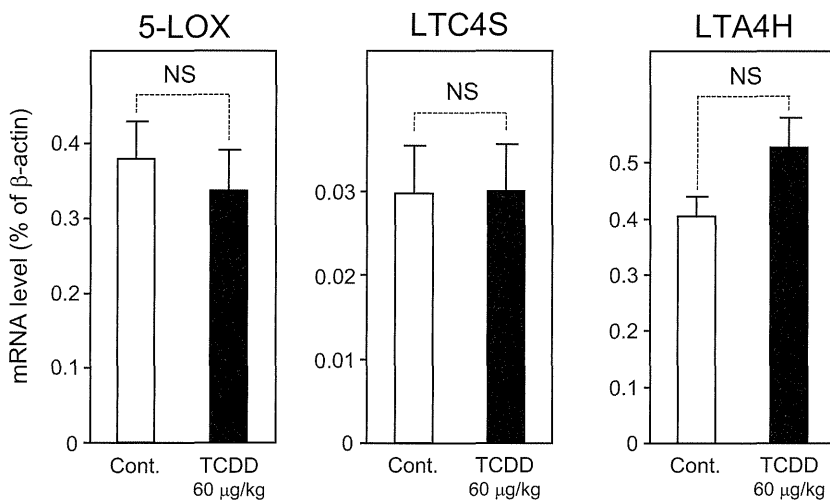


Fig. 4. Absence of TCDD effect on the lung expression of mRNAs coding for leukotriene-synthesizing and -metabolizing enzymes in the lung of male pubertal rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 5-6 rats. NS; not significant.

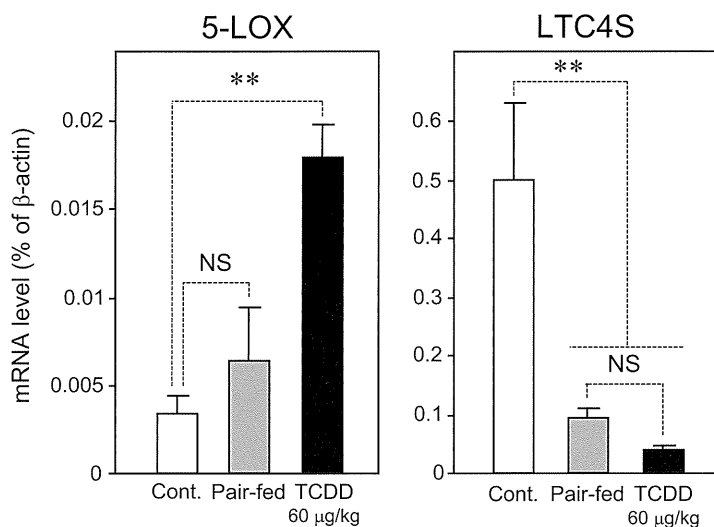


Fig. 5. Effect of a TCDD-induced reduction in food intake on the expression of mRNAs coding for 5-lipoxygenase and LTC₄ synthase in the liver of male pubertal rats. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 5-6 rats. Significantly different between the pair indicated: ** p <0.01. NS; not significant.

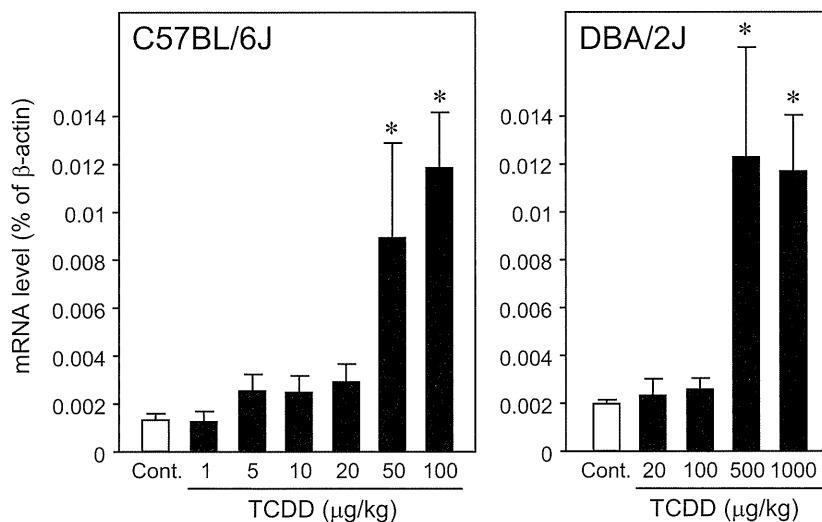


Fig. 6. Dose-dependent effect of TCDD on the expression of 5-lipoxygenase mRNA in the liver of male C57BL/6J and DBA/2J mice. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 3-5 mice. Significantly different from control: * p <0.05.

分担研究報告書

油症原因物質 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran の *in vivo* 毒性再評価

研究分担者	山田 英之	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	教授
研究協力者	石井 祐次	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	准教授
研究協力者	武田 知起	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	助教

研究要旨 我々は、妊娠ラットへの 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露により、周産期児の脳下垂体 luteinizing hormone (LH) が低下し、これを起点として精巣の性ホルモン合成系低下ならびに成長後の交尾行動障害が惹起されることを実証している。本研究では、油症原因物質である PenCDF が TCDD と同様に LH 低下を起点として交尾行動障害を惹起しうるかを検証すると共に、上記の胎児障害や急性毒性に対する 50% 効果量 (ED₅₀) および TCDD に対する相対毒性強度 (RelE-P/T) を算出し、両種の毒性強度を正確に評価した。PenCDF (1-1,000 µg/kg) または TCDD (0.05-60 µg/kg) 母体曝露により、胎児脳下垂体 LH および精巣・性ホルモン合成系の用量依存的な低下が観察され、この低下と合致して出生雄児の交尾行動障害が惹起された。このことから、PenCDF も TCDD と同様に胎児脳下垂体 LH 低下を起点として児の性成熟を障害することが示唆された。両ダイオキシンによる障害の ED₅₀ を基に RelE-P/T を算出したところ、RelE-P/T=0.016-0.06 となり、ダイオキシン毒性の評価に汎用されている毒性等価係数での PenCDF 毒性 (TEF=0.3) よりもかなり低いことが判明した。一方、急性毒性である消耗症に対しても、TCDD および PenCDF 間で予想以上の毒性差が認められたものの (RelE-P/T=0.058-0.145)、胎児毒性に比較すると TEF に近い傾向を示した。以上の成果から、今回の指標で見ると、PenCDF も TCDD と共通した *in vivo* 毒性を示すが、毒性によっては TEF との乖離が大きいことが明らかになった。

A. 研究目的

ダイオキシンによる性未成熟等の後世代毒性は、妊娠期の低用量曝露により児に発現する (1)。これはその感受性の高さや継世代影響の点から問題が大きいが、発現機構が十分に解明されているとは言えない。当研究室では、最強毒性のダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の妊娠ラットへの投与により、周産期児の脳下垂体において luteinizing hormone (LH) が低下し、これを起点として精巣の steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) や cytochrome P450 (CYP) 17 等

の性ホルモン合成系タンパク質の発現低下ならびに成長後の交尾行動障害が惹起されることを明らかにしている (2-5)。さらに、油症の主たる原因物質である 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PenCDF) も、TCDD と同様に胎児 LH および StAR 等の発現低下を用量依存的に惹起するが、その効果発現には TCDD の少なくとも 20 倍以上の高用量を要することを見出している (H22 年度分担研究報告書)。

本研究では、PenCDF が TCDD と同様に胎児 LH 低下を起点として性未成熟を惹起するか否かを検証するとともに、

それらの障害に対する 50% 効果量 (ED₅₀) ならびに TCDD に対する相対毒性強度 (Relative effect of PenCDF to TCDD; RelE-P/T) を算出し、TCDD との毒性強度の違いを正確に評価することを目的とした。さらに本検討では、後世代毒性との比較を行うため、いくつかの急性毒性を指標として同様に ED₅₀ および RelE-P/T を算出し、毒性強度の違いを評価した。

B. 研究方法

i) 動物処理

7-10 週齢の Wistar 系雌性ラットと成熟雄性ラットを一晩交配した。翌朝、膈内洗浄液を採取し、精子が確認された場合はその日を妊娠 0 日目 (GD0) としてその後は個別飼育した。GD15 の妊娠ラットに、PenCDF (1-1,000 µg/kg/2 mL コーン油) あるいは TCDD (0.05-30 µg/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群にはコーン油を経口投与した。GD20 に胎児より臓器および血液を採取した。交尾行動試験においては、GD15 の妊娠ラットに PenCDF (15 および 50 µg/kg) あるいは TCDD (1 µg/kg) を経口投与し、自然に出生させた。生後 21 日目に離乳し、10 週齢まで自然飼育したのち試験に用いた。

急性毒性試験は、5 週齢の Wistar 系雄性ラットに、PenCDF (1-2,000 µg/kg/2 mL コーン油) または TCDD (0.1-60 µg/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群にはコーン油を経口投与した。投与 7 日後に、体重を測定したのち、肝臓および胸腺を摘出し重量を測定した。

ii) イムノブロットィング

StAR タンパク質の発現量はイムノブロット法により (4)、以下の要領で解析した。胎児精巣を 5 mM potassium phosphate buffer [pH7.4; 0.25 M sucrose、0.5 mM EDTA、1mM DTT、20% glycerol] にてホモジナイズした。これを、1,000 × g で 10

分間遠心分離し、上清をさらに 9,000 × g で 25 分間遠心分離し、沈渣をミトコンドリア画分として PBS 溶液 (1% Nonidet P-40、5 mM EDTA) に懸濁させた。これを SDS-PAGE に付し、StAR および標準タンパク質として β-actin の検出を行った。StAR 発現量はβ-actin で補正したのち解析した。

iii) リアルタイム RT-PCR

摘出臓器より total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (6)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green I Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、分析対象 mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β-actin mRNA の Ct 値で補正したのち、対照群に対する割合として算出した。

iv) 交尾行動試験

雄の交尾行動試験は、10 週齢の間に実施した。試験日の朝、被験雄ラットを試験用ケージに移し、夜間に強制発情させた雌ラットを同居させて 30 分間の行動を記録した。雌の強制発情は、あらかじめ卵巣摘出させた雌ラットに、β-estradiol 3-benzoate (20 µg/kg) および progesterone (1 mg) をそれぞれ試験開始の 48 時間前および 6 時間前に皮下投与することにより行った。雄特異的交尾行動の指標には、雌への乗駕 (mount) ならびに生殖器挿入 (intromission) の回数および最初に行動を行うまでの時間 (潜在性) を用いた。

v) 統計処理 (ED₅₀ 算出)

ED₅₀ の算出には、統計解析ソフト GraphPad Prism 5.0 を用いた。得られたデータを非線形回帰の用量-反応曲線にあてはめ、EC₅₀ 値として得た。

(倫理面への配慮)

本研究における全ての動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の

承認を受けた上で、可及的に動物の苦痛を排除して実施した（動物実験承認番号：A23-164-0 および A23-164-1）。

C. 研究結果

PenCDF および TCDD が、胎児精巣の性ホルモン合成系に及ぼす影響を検討した結果、両ダイオキシンともに用量依存的な StAR および CYP17 の mRNA 発現低下を惹起した (Fig. 1A)。これと合致して、胎児精巣の StAR タンパク質の発現低下も観察された (Fig. 1B)。精巣の性ホルモン合成の上位制御因子である脳下垂体 LH (LH β および α -subunit) および血中 LH 濃度も、両ダイオキシンの用量依存的に低下した (Fig. 2)。PenCDF 母体曝露が、出生雄児の性未成熟を惹起するか否かを検討するため、交尾行動を指標として検証した。その結果、胎児 LH が低下する 50 μ g/kg PenCDF 曝露母体より生まれた児では、交尾行動の指標であるマウントおよび生殖器挿入の回数は減少し、潜在性は遅延した (Fig. 3)。これらの障害の程度は、1 μ g/kg TCDD 曝露母体の出生児とほぼ同程度であった (Fig. 3)。一方、LH が低下しない 15 μ g/kg PenCDF 曝露母体群では、出生雄児の交尾行動には影響が認められなかった (Fig. 3)。さらに、ダイオキシンの急性毒性である体重増加抑制、胸腺萎縮、肝肥大ならびに肝 CYP1A1 発現誘導に関しても、両ダイオキシンの用量依存的に惹起された (Fig. 4)。

以上の毒性指標について、ED₅₀ および RelE-P/T を算出し、両ダイオキシンの毒性強度を正確に評価した。その結果、LH 低下をはじめとする胎児障害の ED₅₀ は、PenCDF_{ED50}=21.0-36.6 (μ g/kg) および TCDD_{ED50}=0.36-2.2 (μ g/kg) であり、これを基に RelE-P/T を算出すると 0.016-0.06 となった (Table 1A)。一方、急性毒性に関しては RelE-P/T が 0.058-0.145 となり (Table 1B)、胎児障害に比して両ダイオキ

シン間での毒性差が小さい傾向を示した。

D. 考察

PenCDF および TCDD 母体曝露が胎児脳下垂体および精巣の性ホルモン合成系に及ぼす影響を解析した結果、PenCDF も TCDD と同様に胎児脳下垂体 LH、ならびに精巣 StAR および CYP17 の発現を用量依存的に低下させることが明らかになった。これらの低下は近似する用量で生じることから、PenCDF 母体曝露も胎児 LH 低下を介して精巣の性ホルモン合成系を障害すると考えられた。さらに、PenCDF および TCDD 処理母体の出生児を用いて交尾行動試験を行った結果、LH が低下しない 15 μ g/kg PenCDF 曝露母体群では雄児の交尾行動は正常であったのに対し、LH 低下が生じる 50 μ g/kg PenCDF 曝露母体より出生した雄児は交尾行動が障害され、その程度は 1 μ g/kg TCDD 母体曝露群とほぼ一致した。これらの事実から、ダイオキシンによる児の性未成熟は、TCDD に限定されず PenCDF 母体曝露でも同様に生じ、これらは胎児期の LH 低下によって規定されることが強く示唆された。

両ダイオキシンによる胎児の性ホルモン合成系障害の ED₅₀ および RelE-P/T の算出結果によると、全ての RelE-P/T は 0.02 前後であり、毒性等価係数 (TEF) の 0.3 とは明らかに乖離した。一方、急性毒性を指標とする RelE-P/T は 0.1 前後であり、TEF より小さい傾向ではあるものの、TEF との差は胎児毒性での差よりも縮小した。これらの毒性差は、両ダイオキシンの胎児移行性の違いで説明できる可能性がある。すなわち、母体に曝露された PenCDF の胎児への移行率は TCDD の 1/10 程度と報告されている (7)。また、油症患者の母子ダイオキシン濃度や健常妊婦におけるダイオキシン類の胎盤透過率を検討した臨床データからも、PenCDF は

PCDD 類よりも胎児への移行率が低いと推定されている (8,9)。さらに、両ダイオキシンの胎児移行率の差をもたらす要因として、肝臓に高発現する CYP1A2 が重要であることを示唆する知見も得られている (10-12)。すなわち、CYP1A2 は PenCDF と特異的かつ強固に結合し (10)、野生型マウスに TCDD あるいは PenCDF を投与した場合、PenCDF の肝臓集積性は TCDD に比較して高値を示すが、CYP1A2 欠損マウスにおいては、その肝臓集積性は消失すると言う (11, 12)。これらを総合すると、PenCDF は TCDD よりも母ラットの肝 CYP1A2 に強く捕捉されることで胎児への移行が制限され、結果として胎児への毒性が弱くなる可能性が考えられる。母体の CYP1A2 に着目し、胎児移行率と毒性発現への関与に関して詳細に検討を行うことが今後の課題である。

E. 結論

PenCDF も、TCDD と同様に胎児脳下垂体および精巣の性ホルモン合成系を障害し、成長後に交尾行動障害を惹起するが、その毒性強度は TCDD の 1/40 以下であることが明らかになった。一方、PenCDF による急性毒性は、TCDD の 1/10 前後の強度であり、胎児障害に比較すると毒性差が TEF (0.3) に近似した。

F. 引用文献

- 1) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL, *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**: 283-335 (1993).
- 2) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y, Yamada H, *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
- 3) Taketoh J, Mutoh J, Takeda T, Ogishima T, Takeda S, Ishida T, Ishii Y, Yamada H, *Life Sci.*, **80**: 1259-1267 (2007).
- 4) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T,

Yamada H, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**: 1091-1099 (2009).

5) Takeda T, Fujii M, Taura J, Ishii Y, Yamada H, *J. Biol. Chem.*, **287**: 18440-18450 (2012).

6) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H, *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 365-373 (2010).

7) Chen C, Hamm JT, Hass JR, Birnbaum LS, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **173**: 65-88 (2001).

8) Tsukimori K, Uchi H, Mitoma C, Yasukawa F, Fukushima K, Todaka T, Kajiwara J, Yoshimura T, Hirata T, Wake N, Furue M, *Chemosphere*, **84**: 928-935 (2011).

9) Tsukimori K, Morokuma S, Hori T, Takahashi K, Hirata T, Otera Y, Fukushima K, Kawamoto T, Wake N, *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **39**: 83-90 (2013).

10) Kuroki J, Koga N, Yoshimura H, *Chemosphere*, **15**: 731-738 (1986).

11) Diliberto JJ, Burgin DE, Birnbaum LS, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **159**: 52-64 (1999).

12) Dragin N, Dalton TP, Miller ML, Shertzer HG, Nebert DW, *J. Biol. Chem.*, **281**: 18591-18600 (2006).

G. 学会発表

1. フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012 年 10 月、名古屋)
2. 第 11 回ファーマバイオフォーラム (2012 年 9 月、福岡)
3. 第 28 回日本薬学会九州支部大会 (2012 年 12 月、熊本)
4. 第 11 回環境予防医学研究会 (2013 年 2 月、筑波)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

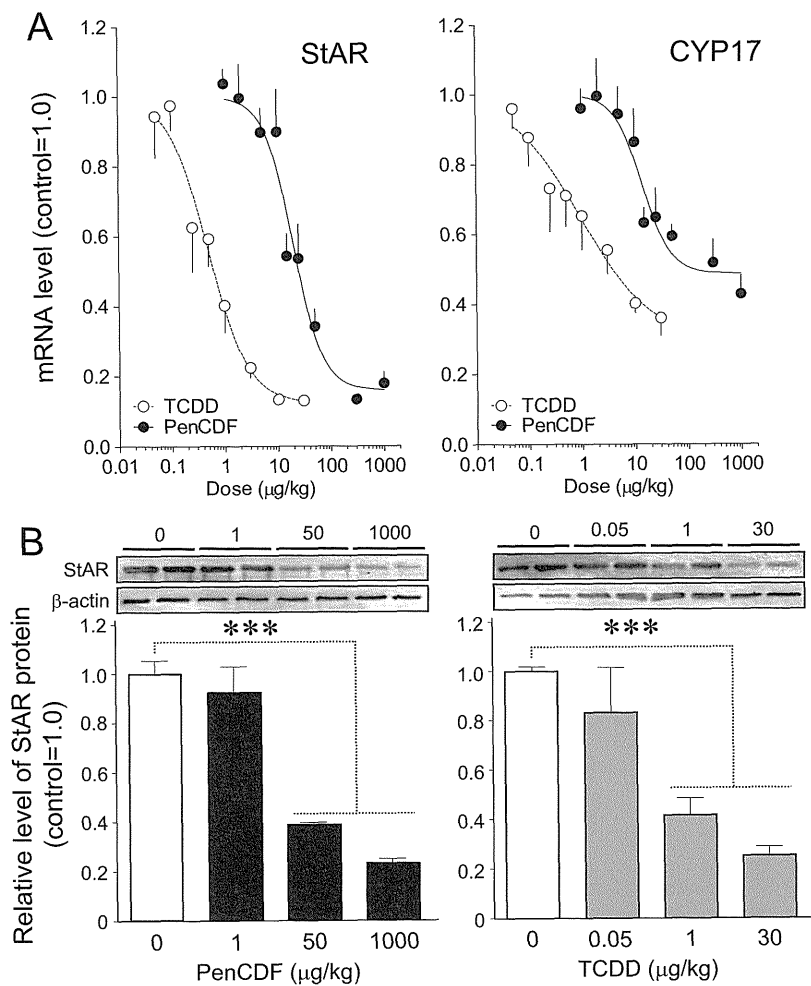


Fig. 1. Dose-dependent effect of maternal exposure to PenCDF and TCDD on the testicular expression of mRNAs coding for StAR and CYP17 (A) and StAR protein (B) in male fetal rats. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 fetuses which were removed from different dams. The level of StAR and CYP17 mRNAs in control fetuses in vehicle-treated dams was 7.86 ± 0.47 and 19.9 ± 1.4 , respectively (% of β -actin; mean \pm S.E.M., N=4-6). Significantly different from the control; *** $p < 0.001$.

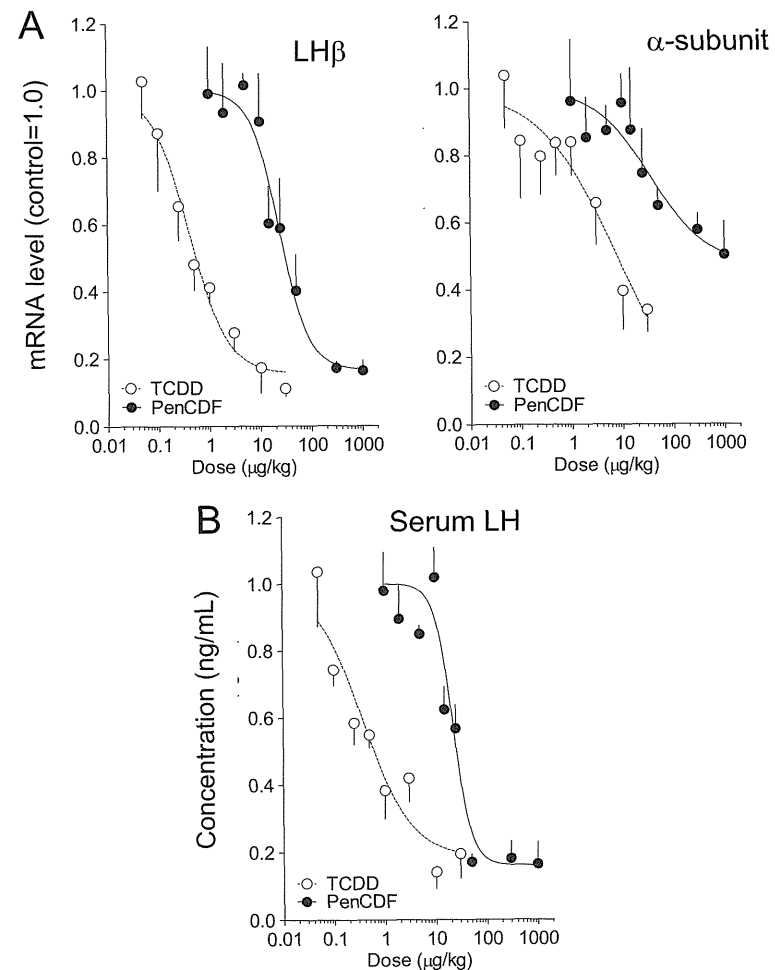


Fig. 2. Effect of maternal exposure to PenCDF and TCDD on the pituitary expression of mRNAs coding for LH β and its α -subunit (A), and serum concentration of LH (B) in male fetal rats. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 3-6 fetuses which were removed from different dams. The level of LH β and its α -subunit mRNAs in control fetuses in vehicle-treated dams was 4.93 ± 0.35 and 60.7 ± 2.2 , respectively (% of β -actin; mean \pm S.E.M., N=5-6). The level of serum LH (ng/mL, mean \pm S.E.M.) in control fetuses in vehicle-treated dams was 1.07 ± 0.26 (N=6).

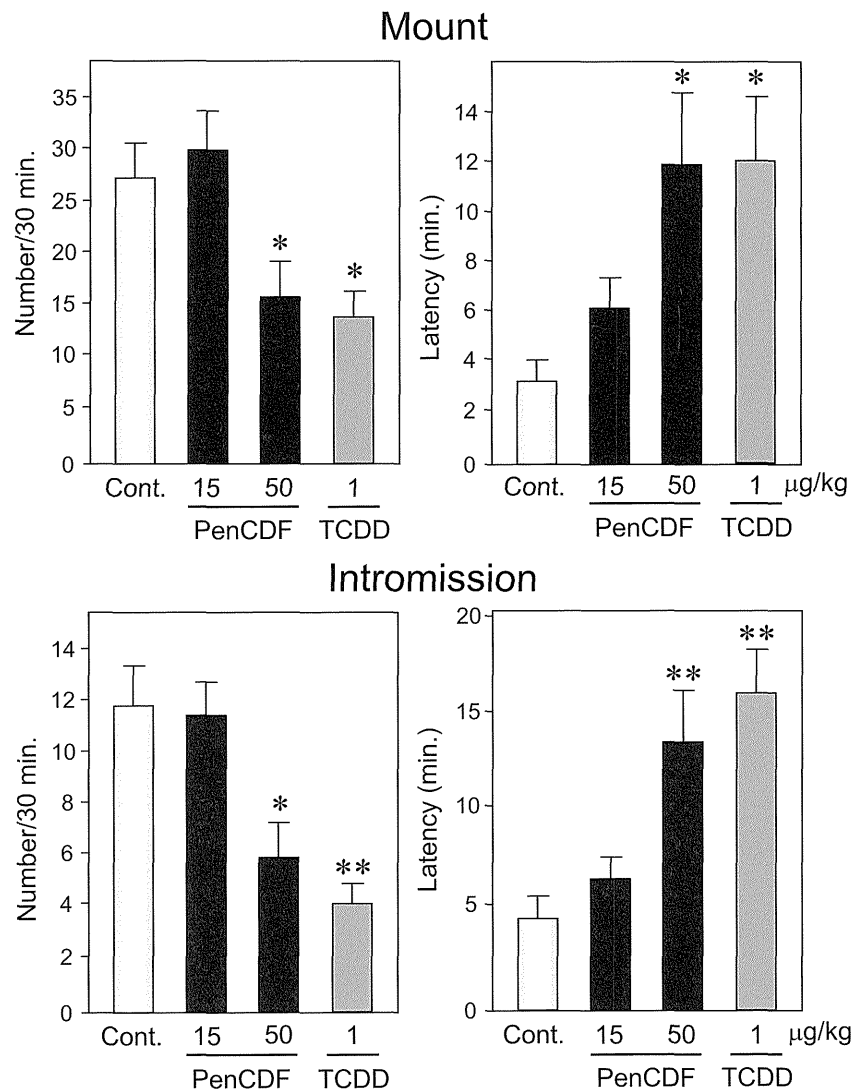


Fig. 3. Defects in masculine sexual behavior in adult male rats which were born from the dams exposed to PenCDF and TCDD. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 8-18 male rats. Significantly different from the control; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

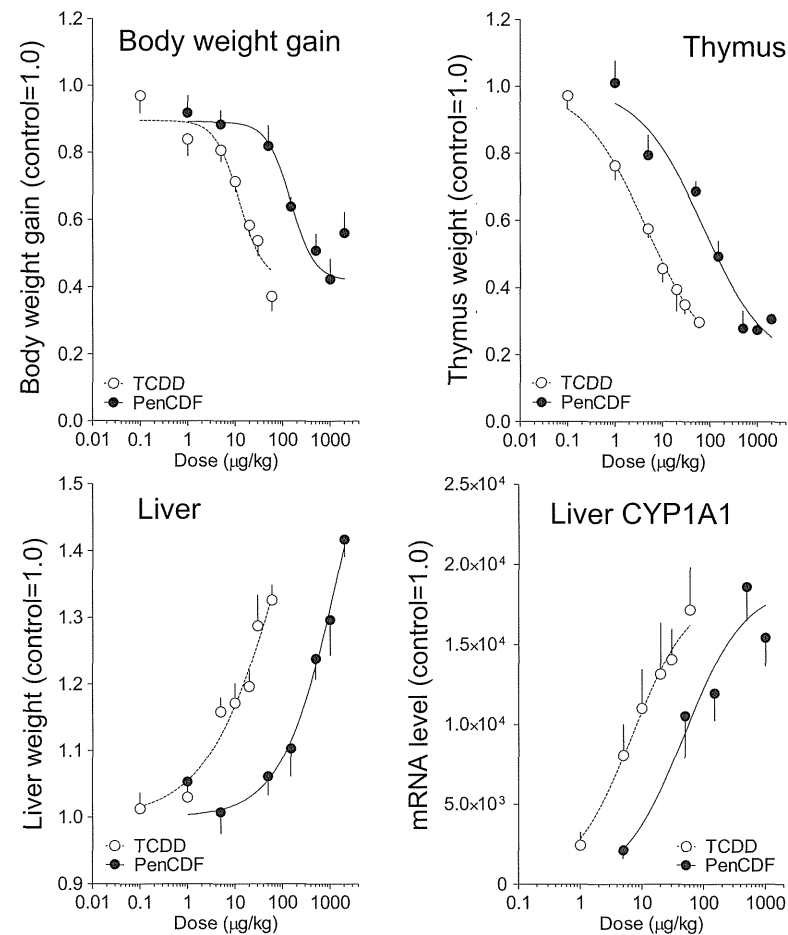


Fig. 4. Dose-effect relationship between PenCDF- and TCDD-induced change in the weight of body, thymus and liver, and hepatic expression of CYP1A1 mRNA in 5 weeks-old male rats. Each plot represents the mean \pm S.E.M. of 5-14 rats. Body weight in the control rats (corn oil-treated rats) at the beginning of treatment was 135 ± 4 g (mean \pm S.E.M., $N=25$). Body weight gain in the control rats was 61.4 ± 1.8 ($N=25$). The weight of the liver and thymus at the day of operation was 9.88 ± 0.24 g ($N=25$) and 620 ± 17 mg ($N=25$), respectively. Control level of hepatic CYP1A1 mRNA (% of β -actin) was 0.027 ± 0.006 ($N=25$).

Table 1. Effective dose 50% (ED₅₀) and relative effect of PenCDF to TCDD (RelE-P/T)

A. Data for toxic effect on male fetuses

Index	ED ₅₀ (μg/kg)		RelE-P/T
	PenCDF	TCDD	
StAR mRNA	21.0 ± 3.6	0.46 ± 0.09	0.022
CYP17 mRNA	21.1 ± 8.0	0.51 ± 0.20	0.024
LHβ mRNA	24.9 ± 6.5	0.39 ± 0.11	0.016
α-subunit mRNA	36.6 ± 47.0	2.2 ± 1.0	0.060
Serum LH	21.5 ± 4.9	0.36 ± 0.08	0.017

B. Data for toxic effect on male pubertal rats

Index	ED ₅₀ (μg/kg)		RelE-P/T
	PenCDF	TCDD	
Body weight loss	146 ± 46	12.2 ± 3.2	0.083
Thymic atrophy	71.9 ± 29.1	4.5 ± 1.7	0.062
Hepatomegaly	1,560 ± 2,480	90 ± 194	0.058
CYP1A1 induction	48.1 ± 29.3	7.0 ± 3.7	0.145

分担研究報告書

油症患者血液中 PCB 等追跡調査における分析法の改良およびその評価に関する研究

研究分担者	平田輝昭	福岡県保健環境研究所	所長
研究協力者	梶原淳睦	福岡県保健環境研究所	生活化学課 課長
	平川博仙	福岡県保健環境研究所	生活化学課 専門研究員
	堀 就英	福岡県保健環境研究所	生活化学課 専門研究員
	飛石和大	福岡県保健環境研究所	計測技術課 研究員
	宮脇 崇	福岡県保健環境研究所	計測技術課 主任技師
	戸高 尊	九州大学医学部	学術研究員
	飯田隆雄	(財)北九州生活科学センター	理事

研究要旨 油症認定患者は体内のダイオキシン、PCB 濃度が高いため PCB 代謝活性が変化していると推察されている。PCB の代謝物である水酸化 (OH) PCB を測定するため血液中ダイオキシン及び PCB 類一斉分析法の精製工程を検討し、OH-PCB 類を同時に測定できる分析法を開発した。本分析法を用い平成 22 年度油症一斉検診の油症認定患者(総数 230 名)の一部(180 名)の血液中 OH-PCB 濃度を測定した結果、油症認定患者の血液中総 OH-PCB 濃度は一般人の約 4 倍であり、最も濃度の高い OH-PCB 異性体は 4-OH-CB187 であることが明らかになった。油症認定患者の血液中 OH-PCB 濃度と臨床症状との関係の解明並びにダイオキシン、PCB 類との関連を解析する予定である。

A. 研究目的

「血中 PCB 濃度及び性状の異常」は油症診断基準の所見のひとつである。「血中 PCB 濃度」は一般人でも高い場合があるため「血中 PCB の性状」の異常が油症診断に採用されている。「PCB の性状」とは、PCB のパックドカラムガスクロマトグラムピークパターン (GC パターン) のことであり、その異常とは油症認定患者の PCB GC パターンが一般人とは異なる特有の GC パターンを示すことを指している。具体的には油症認定患者では血液中 PCB GC パターンの PCB #118 を主成分とするピーク 1 が相対的に低く、PCB#156 を主成分とするピーク 5 が相対的に高いことに基づいており、最も濃度の高い PCB#153 を主成分とするピーク 2 を基準として、これに対する比を取ることによって、油症認定患者と一般人の違いを明確にすることができる。

生体内に取り込まれた PCB 類は、チトクローム P450 等の酵素により OH-PCB に代謝され排泄されると考えられており、

PCB#118 が相対的に低い原因は、油症認定患者は体内のダイオキシン、PCB 濃度が高いため代謝酵素が誘導されていると推察されている。一方、一部の OH-PCB 異性体は甲状腺ホルモンと類似した構造を持つため、レセプターと結合し生体内に残留することが報告され、PCB よりも強い内分泌かく乱作用があるのではないかと懸念されている。

本研究では血液中ダイオキシン、PCB 及び OH-PCB 類一斉分析法を用いて油症認定患者の血液中 OH-PCB 濃度を測定し、OH-PCB の生体影響解明の基礎資料を得ることを目的にした。

B. 研究方法

油症一斉検診で行っている血液中ダイオキシン、PCB 類一斉分析方法の精製工程を検討し、OH-PCB も同時に測定できる一斉分析法を開発した。図 1 に我々が開発した血液中ダイオキシン、PCB 及び OH-PCB 一斉分析法のフローを示した。OH-PCB は